

Control de calidad en la preparación de test de aliento para el diagnóstico de malabsorción de glúcidos

Rev. O.F.I.L. 2014, 24;4:251-256

Fecha de recepción: 30/06/2014 - Fecha de aceptación: 11/09/2014

ALONSO HERREROS JM¹, ZINK LORRE N²

1 Especialista en Farmacia Hospitalaria. Especialista en Farmacia Industrial y Galénica. Facultativo Especialista de Área. Hospital Los Arcos Mar Menor. San Javier (Murcia) España

2 Licenciada en Farmacia. Becaria de Investigación. Departamento de Química Orgánica. Universidad Miguel Hernández. Alicante. España

Presentado parcialmente en el 57 Congreso de la SEFH (Bilbao, 2-5 octubre 2012).

Resumen

Objetivos: El análisis de las sustancias volátiles que se exhalan con el aliento es una prometedora técnica diagnóstica no invasiva, especialmente en patologías del tracto gastrointestinal. En el caso del diagnóstico de la malabsorción de azúcares, tras la administración de una dosis de estos productos (sorbitol, xilosa, fructosa, glucosa o lactosa) se producen su fermentación por la flora saprófita del intestino por lo que se puede detectar en el aliento H₂, CH₄ o CO₂.

El aseguramiento de la calidad de las preparaciones que se usan en estos test –que suelen realizarse en farmacia– es esencial dado el riesgo para el paciente que tendría un error en el diagnóstico. En el presente trabajo presentamos un procedimiento analítico rápido y eficiente para aplicar en el producto final de la preparación, antes de la liberación de lotes.

Método: Revisión bibliográfica de técnicas de identificación y propiedades químicas que permitiesen la diferenciación de los productos implicados.

Resultados: Se desarrolla un procedimiento combinando la determinación de puntos de fusión con pruebas colorimétricas.

Conclusiones: El procedimiento establecido permite el control de calidad del producto terminado de forma rápida y eficiente. Es necesario ir desarrollando técnicas de control de calidad sobre el producto final para ir incrementando la calidad de las preparaciones realizadas en los hospitales. La determinación del punto de fusión, a pesar de ser obligatoria en los servicios y oficinas de farmacia que se dedican a la formulación, es una técnica con limitaciones a la hora de realizar controles de calidad.

Palabras clave: Test de aliento, control de calidad, punto de fusión, test colorimétricos, malabsorción.

Correspondencia:

José María Alonso Herreros
Hospital Los Arcos Mar Menor
Paraje Torre Octavio, 54
30739 Pozo Aledo, San Javier (Murcia)
Correo electrónico: josem.alonso@carm.es

Quality control in the preparation of breath test for the diagnosis of glucides malabsorption

Summary

Objectives: Analysis of volatile substances in exhaled breath is a promising noninvasive diagnostic technique, especially in diseases of the gastrointestinal tract. In the case of diagnosis of malabsorption of glucides, after administration of a dose of these (sorbitol, xylose, fructose, glucose or lactose), fermentation products produced by saprophytic intestinal flora (H_2 , CH_4 or CO_2) are detectable in the breath.

The quality assurance of the preparations used in these tests -often made in pharmacy- is essential given the risk to the patient would have an error in diagnosis.

In this paper we present a fast and efficient analytical procedure to apply in the final product before batch release.

Method: A review of identification techniques and chemical properties that allowed the differentiation of the products involved.

Results: A method combining melting point determination with colorimetric test is developed.

Conclusions: The method developed allows quality control of the finished product quickly and efficiently. It is necessary develop techniques for quality control of the final product, to increase the quality of the preparations made in hospitals. The determination of the melting point is a technique with limitations in performing quality controls, although in Spain the pharmacies and hospital pharmacy services accredited for compounding medicines have a legal obligation to have it available.

Key Words: Breath tests, quality assurance, melting point, colorimetric assay, malabsorption.

Introducción

Los test de aliento son un prometedor campo para el diagnóstico no invasivo de un gran número de enfermedades¹. Básicamente se trata de la detección de compuestos volátiles en el aliento con técnicas de alta sensibilidad y exactitud como la cromatografía de gases. En ocasiones, estos compuestos volátiles proceden de la administración oral previa de algún agente diagnóstico.

Entre otros usos se puede utilizar como una prueba funcional digestiva para estudiar síndromes de malabsorción primaria y secundaria de diferentes azúcares^{2,3}. Al paciente se le administra una dosis del producto en cuestión (sorbitol, xilosa, fructosa, glucosa o lactosa) generalmente disuelta en agua. Si presenta un problema de malabsorción, el azúcar permanecerá en la luz del tracto digestivo, las bacterias saprófitas del mismo lo fermentarán y

habrá liberación de H_2 , CH_4 y CO_2 , que se podrán detectar mediante gasometría en el aliento.

Las dosis son preparadas en el servicio de farmacia a partir de la sustancia pura, calidad farmacéutica. Dada la frecuencia de uso (Tabla 1), y las posibles consecuencias para el paciente de un error diagnóstico, se planteó la necesidad de establecer un control de identidad del azúcar antes de la liberación de los lotes de las distintas preparaciones. De esta forma se pretende asegurar la ausencia de errores de etiquetado o identificación durante el proceso de elaboración, y acercar la calidad de la elaboración de preparados hospitalarios a la calidad que ofrece la industria farmacéutica.

Este control de identidad –de una forma ideal– debería de reunir las siguientes características:

Especificidad: Había que diferenciar 5 azúcares que son similares entre sí.

Fiabilidad: Que siempre dé los mismo resultados y que no varíe con el personal que realiza el test.

Sencillez: Que pueda ser realizado por personal técnico y no precise de personal facultativo.

Económico: Para optimizar los recursos.

Rapidez: Dadas las limitaciones del espacio de almacenamiento en el área de elaboración que no permite disponer de espacio suficiente para la inmovilización de grandes lotes durante largos periodos.

El objetivo del presente trabajo es presentar el desarrollo del procedimiento de identificación de azúcares como control de calidad, previo a la liberación de los lotes, de los preparados utilizados en los test de aliento.

Material y métodos

Se realizó una búsqueda bibliográfica de las características químicas y de las reacciones de identificación de los azúcares implicados^{4,5,6}. Para las pruebas realizadas se emplearon los mismos productos que en la práctica clínica habitual: sorbitol, xilosa, fructosa, glucosa y lactosa proporcionados por ACOFARMA SA (Barcelona, España). El orcinol, resorcinol, el cloruro férrico y el ácido clorhídrico necesarios para la preparación de los reactivos de Bial y Seliwanoff se obtuvieron de PANREAC SA (Barcelona, España).

Para la determinación del punto de fusión se utilizó un equipo SMP101Ud digital, con temperatura de trabajo +5 a 300°C, con resolución de 1°C proporcionado por GUINAMA SLU (Valencia, España).

Resultados

Dados los requisitos propuestos el uso de técnicas de identificación como espectroscopía infrarroja o cromatografías quedaron descartadas desde el primer momento.

Ya que en España se exige a los servicio de farmacia disponer de un equipo de determinación de punto de fusión⁷, se intentó diferenciar los azúcares mediante esta técnica. Como se puede observar en la tabla 2 hay puntos de fusión similares dos a dos (fructosa/sorbitol y

Tabla 1
Lotes y unidades de los distintos test de aliento preparados anualmente

Test de aliento	Lotes anuales	Unidades anuales
Fructosa 25 g	12	275
Glucosa 75 g	6	180
Lactosa 25 g	15	350
Xilosa 25 g	5	100

xilosa/glucosa) por lo que dicha técnica no sería suficientemente fiable para los objetivos planteados.

De forma parecida la diferencia de solubilidades en disolventes orgánicos e inorgánicos tampoco se mostró suficientemente sensible en las pruebas realizadas.

Los azúcares implicados, al ser de distintas familias químicas (aldosas, cetosas...) si que podrían diferenciarse por reacciones colorimétricas. Entre las reacciones de este tipo que se producen en los azúcares se pueden citar:

1. Reacción de Molisch

Pone de manifiesto la presencia de carbohidratos en una muestra. Se basa en la acción hidrolizante y deshidratante del ácido sulfúrico sobre los hidratos de carbono. En dicha reacción el ácido sulfúrico cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de la muestra y la deshidratación a furfural (en las pentosas) o hidroximetilfurfural (en las hexosas).

2. Reacción de Benedict

Esta reacción es específica para azúcares con grupo reductores libres (C=O). Todos los monosacáridos poseen un grupo reductor libre. Los disacáridos maltosa y lactosa tienen grupos reductores libres, pero la sacarosa no los posee, ya que se pierden los grupos reductores de sus componentes cuando ésta es formada.

Se basa en la capacidad del carbohidrato de reducir el Cu²⁺ en un medio alcalino. Este Cu¹⁺ se oxida y precipita en forma de Cu₂O, lo que proporciona la coloración positiva de la reacción. La coloración dependerá de la concentración de óxido de cobre y ésta a su vez

Tabla 2
Características químicas de los azúcares implicados en los test de aliento

Azúcar	Descripción	Tipo de azúcar	Punto de fusión (°C)	Solubilidad	Reacción colorimétrica
Fructosa	Polvo blanco	Cetohexosa	107	Soluble en agua	Si (Seliwanoff)
Xilosa	Polvo blanco	aldopentosa	145-155	1g en 0.8 ml de agua. Piridina y alcohol caliente	Si (Bial)
Sorbitol	Polvo blanco	polialcohol	102	Soluble en disolventes orgánicos: metanol, isopropanolol, butanol	no
Glucosa	Polvo blanco	hexosa	143	1g en 1ml de agua	no
Lactosa	Polvo blanco	disacárido	>200	Insoluble en cloroformo y éter. Poco soluble en alcohol. 1g en 5 ml de H ₂ O	no

de la reducción del cobre; va desde verde, amarillo, anaranjado o rojizo, dependiendo de la coloración.

3. Reacción de Seliwanoff

Los carbohidratos se clasifican como cetosas o aldosas. Vale decir, que las cetosas en el carbono 2 tienen una función cetona, que en presencia de un ácido fuerte producen rápidamente derivados furfúricos que reaccionan con resorcina que está contenido en el reactivo de Seliwanoff. La sacarosa (un disacárido formado por glucosa y fructosa) y la inulina (un polisacárido de la fructosa) dan positiva la reacción, ya que el HCl del reactivo provoca en caliente la hidrólisis del compuesto liberando fructosa (responsable de la reacción positiva).

4. Ensayo de Barfoed

Esta prueba permite diferenciar entre monosacáridos y disacáridos reductores, también contiene ión cúprico que se reduce hasta óxido cuproso más rápidamente con los monosacáridos que con los disacáridos.

5. Ensayo con Lugol

El reactivo de Lugol que contiene una mezcla de yodo y yoduro, permite reconocer polisacáridos, particularmente el almidón por la formación de una coloración azul violeta intensa y el glicógeno y las dextrinas por formación de coloración roja.

6. Ensayo de Bial

Es una prueba específica para pentosas. Por la formación de una coloración verde botella

brillante que se produce con el reactivo de Bial, que contiene orcinol y cloruro férrico en ácido clorhídrico.

7. Ensayo Fenilhidrazina

Es una prueba para distinguir osas (y oligosacáridos). Los carbohidratos que solo se diferencian en sus átomos de carbono 1 y/o 2 darán la misma osazona, como es el caso de la glucosa y la fructosa, que son isómeros de función.

Al comprobar estas reacciones y los azúcares implicados podemos comprobar que ninguna de ellas, o una combinación de ellas nos es útil para diferenciar todos los azúcares implicados en los test de aliento. Es por ello que se necesita combinar la determinación del punto de fusión con alguna de estas técnicas para asegurarnos la correcta y rápida identificación del producto.

Para ello se establece el siguiente procedimiento (Gráfico 1):

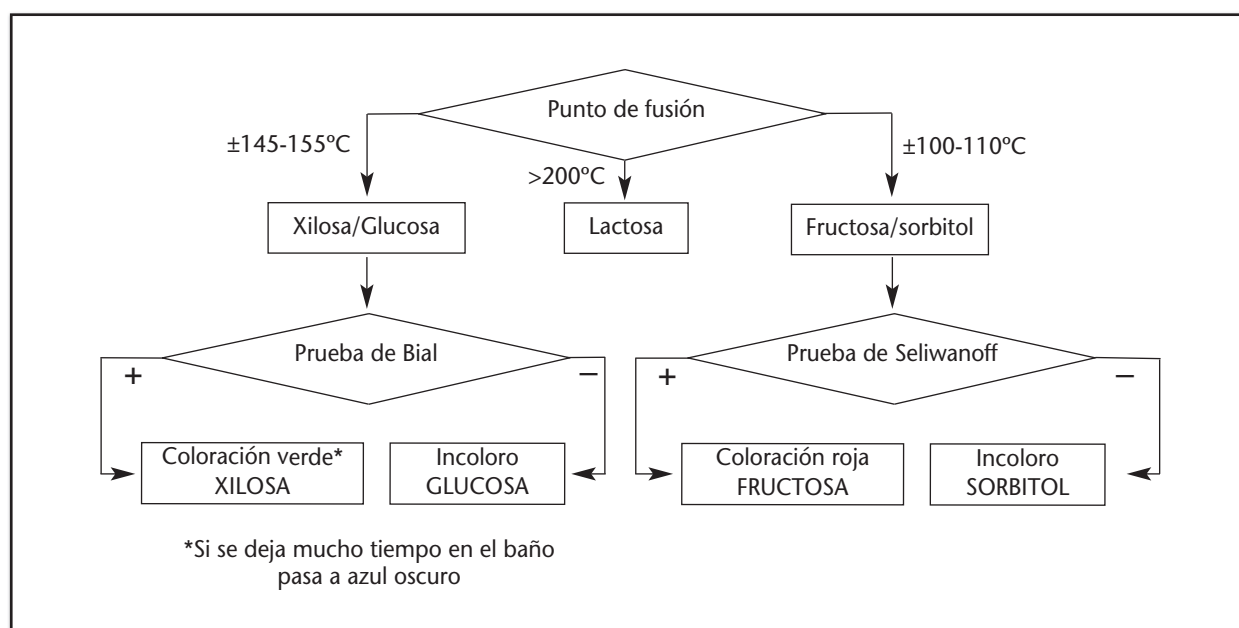
El primer paso sería hacer el punto de fusión de cualquiera de las muestras a analizar.

Con esto diferenciamos la lactosa que tiene un punto mucho más alto que los demás (llega a caramelizar antes de fundirse).

Los 4 azúcares restantes tienen puntos de fusión similares 2 a 2. En la práctica podríamos diferenciar con esta técnica la fructosa y el sorbitol (pf +/- 100-110) de la glucosa y la xilosa (pf +/-145-155).

Luego mediante la prueba de Seliwanoff, específico para cetosas, diferenciamos la fruc-

Gráfico 1
Árbol de decisión para el control de calidad del producto final
para la realización de test de aliento



tosa del sorbitol, y con la de Bial, específico para las pentosas, la xilosa de la glucosa.

Para realizar la prueba de Bial se toman muestras de azúcar que pueda ser xilosa o glucosa (punto de fusión $140-150^{\circ}\text{C}$). A 1 ml del reactivo se le añade una pequeña cantidad del producto a estudiar (menos del 10% del volumen del reactivo). Se calienta al baño maría (100°C). Tras unos minutos (entre 3 y 10), si se vuelve verde la muestra es xilosa, si no cambia de color es glucosa. Con el tiempo el verde pasa a ser azul oscuro.

Para realizar la prueba de Seliwanoff se toman muestras del producto que podría ser fructosa o sorbitol (punto de fusión entre $100-110^{\circ}\text{C}$). A un ml de reactivo se le añade una pequeña cantidad del azúcar a identificar (menos del 10% del volumen del reactivo). Se calienta al baño maría (100°C). Tras 5-10 minutos, si se vuelve rojo la muestra contiene fructosa, si no cambia de color estaremos ante sorbitol

Elaboración de reactivos

Preparación del reactivo de Bial:

Se añaden 300 ml de HCl concentrado en 250 ml de agua destilada, (nunca hacer en sentido inverso). Añadir 1.5 g de orcinol y 8 gotas de cloruro férrico al 1%.

Preparación del reactivo de Seliwanoff:

Se disuelven 0.5 g de resorcinol en 100 ml de agua destilada. A 3 ml de esta disolución le añadimos 12 ml de HCl concentrado. Una vez mezclado le añadimos agua destilada c.s.p 35 ml.

Ambos reactivos se consideran estables durante un año. En caso de duda se puede comprobar su estado realizando la reacción con un azúcar conocido y comprobando la coloración obtenida. En su conservación se debe considerar su contenido ácido.

Conclusiones

El procedimiento propuesto cumple los requisitos establecidos, y permite la rápida identificación de los azúcares empleados en los test de aliento, por lo que posibilita un control de calidad sobre el producto terminado que asegura la ausencia de errores de etiquetado o de preparación.

Es necesario ir incorporando este tipo de controles sobre los productos terminados en farmacia hospitalaria, para ir mejorando en el aseguramiento de la calidad e ir aproximándonos a los niveles de la calidad industrial.

Por último, es necesario señalar las limitaciones prácticas de la determinación de punto

de fusión –técnica que la legislación española obliga a tener disponible en los servicios y oficinas de farmacia que realicen formulas magistrales– para identificar sustancias.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Bibliografía

1. Lourenço C, Turner C. Breath Analysis in Disease Diagnosis: Methodological Considerations and Applications. *Metabolites* 2014,4,465-498
2. Cammarota G, Tondi P, Pola P, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Abnormal breath tests to lactose, fructose and sorbitol in irritable bowel syndrome may be explained by small intestinal bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005 Jun 1;21(11):1391-5.
3. Goebel-Stengel M, Stengel A, Schmidt-mann M, Voort Iv, Kobelt P, Mönnikes H. Unclear abdominal discomfort: pivotal role of carbohydrate malabsorption. *J Neurogastroenterol Motil.* 2014 Apr 30;20(2):228-35.
4. The Merck Index. <http://www.rsc.org/Publishing/Merckindex/Online.asp> (última consulta junio 2014).
5. Real Farmacopea Española. <http://extranet.boe.es/index.php?referer=/farmacopea/index.php> (última consulta junio 2014).
6. Farmacopea Europea. <http://online6.edqm.eu/spanish7/>(última consulta junio 2014).
7. Capítulo 2. Apartado 2.2.5. Real Decreto 175/2001, de 23 de febrero, por el que se aprueban las normas de correcta elaboración y control de calidad de fórmulas magistrales y preparados oficinales. *Boletín Oficial del Estado.* 16 de Marzo de 2001. página 9753.